

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

Citación provisional:

Londoño-Velasco E, Martínez-Perafán F, Carvajal S, García-Vallejo F, Hoyos-Giraldo LS. Evaluación del daño oxidativo y metilante en el ADN de pintores expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos y pinturas. *Biomédica*. 2019;39(3).

Recibido: 05-02-18

Aceptado: 23-10-18

Publicación en línea: 09-11-18

**Evaluación del daño oxidativo y metilante en el ADN de pintores expuestos
ocupacionalmente a solventes orgánicos y pinturas**

Daño oxidativo y metilante en el ADN de pintores

**Evaluation of oxidative and methylating DNA damage in painters
occupationally exposed to organic solvents and paints**

Elizabeth Londoño-Velasco ^{1,2*}, Fabián Martínez-Perafán ^{1,3}, Silvio Carvajal ¹⁺,
Felipe García-Vallejo ⁴, Luz Stella Hoyos-Giraldo ¹

¹ Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética, Departamento de
Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación, Universidad
del Cauca, Popayán, Colombia

² Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Facultad de Ciencias de la
Salud, Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia

³ Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica, Departamento de Bioquímica
Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad
Autónoma de Buenos Aires, Argentina

⁴ Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Departamento de Ciencias
Fisiológicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

+ Fallecido el 29 de enero de 2015

Correspondencia:

Elizabeth Londoño-Velasco, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud,
Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana seccional Cali.
Calle 18 No. 118-250, Cali, Colombia.
Número telefónico: + 57- 2 3218200, ext- 8811.
elivelasco@javerianacali.edu.co

Contribución de los autores:

Elizabeth Londoño-Velasco y Fabián Martínez-Perafán: planificación y ejecución de la investigación; adquisición, análisis e interpretación de los datos; escritura del manuscrito.

Silvio Carvajal: análisis estadístico de los datos e interpretación de los resultados.

Felipe García-Vallejo y Luz Stella Hoyos-Giraldo: planificación y supervisión de la investigación, interpretación de los resultados y revisión crítica del manuscrito.

Introducción. La exposición a solventes orgánicos (SO) y pinturas ha sido asociada con genotoxicidad y mayor riesgo de neoplasias. Sin embargo, aún no ha sido bien caracterizado el tipo de daño en el ADN que induce esta exposición en humanos. Este conocimiento permitiría aclarar los mecanismos de genotoxicidad originada por estos compuestos. Uno de los grupos con mayor exposición a SO y pinturas son los pintores de carros del sector informal, quienes trabajan sin adecuadas prácticas de seguridad ocupacional.

Objetivo. Identificar el daño oxidativo y metilante en el ADN de linfocitos de pintores de carros expuestos a SO y pinturas.

Materiales y métodos. Linfocitos aislados de sangre periférica de 62 pintores y 62 sujetos no expuestos fueron analizados mediante el ensayo cometa de alta eficiencia, acoplado a las enzimas Fpg y AlkA. Las categorías de daño en el ADN evaluadas fueron daño basal (sin enzimas), oxidativo y metilante. El parámetro de medición del daño fue porcentaje de ADN en cola (%ADNC).

Resultados. El %ADNC fue mayor en el grupo expuesto con respecto al no expuesto ($p < 0,05$). En el grupo expuesto el %ADNC fue mayor en la categoría daño oxidativo con respecto al basal (16,50 vs 12,87; $p < 0,001$), mientras que el daño metilante no mostró diferencias significativas (14,00 vs 12,87; $p > 0,05$).

Conclusión. La exposición a SO y pinturas se asoció con un aumento de lesiones oxidativas en el ADN de linfocitos de pintores de carros, tales como 8-oxodG y otros productos formamidopirimidina, los cuales son considerados altamente mutagénicos.

Palabras clave: exposición ocupacional; daño del ADN; ensayo cometa; ADN-formamidopirimidina glicosilasa; N-glicosil hidrolasas.

Introduction. Exposure to organic solvents (OS) and paints has been associated with genotoxicity and increased risk of neoplasms. However, the type of DNA damage induced for this exposure has not been yet fully characterized in humans. This knowledge would explain the mechanisms of genotoxicity caused by these compounds. Car painters in informal sector are a group highly exposed to OS and paints, due to inadequate practices of occupational safety.

Objective. To identify the oxidative and methylating damage in the DNA of lymphocytes of car painters exposed to OS and paints.

Materials and methods. Isolated peripheral blood lymphocytes from 62 painters and 62 unexposed subjects were analyzed by the high-throughput comet assay, coupled to the Fpg and AlkA enzymes. The categories of DNA damage evaluated were basal damage (without enzymes), oxidative and methylating damage. The parameter used to measure the damage was the percentage of DNA in tail (%TDNA).

Results The %TDNA was higher in the exposed group compare to the unexposed ($p < 0.05$). In the exposed group, the %TDNA was higher in the oxidative damage category than the baseline (16.50 vs 12.87, $p < 0.001$), whereas the methylating damage did not show significant differences (14.00 vs 12.87; $p > 0.05$).

Conclusion. In this study, exposure to OS and paints was associated with an increase in oxidative lesions in the DNA of car painters lymphocytes, such as 8-oxodG and other formamidopyrimidine products, which are considered highly mutagenic.

Keywords: Occupational exposure; DNA damage, comet assay; DNA-formamidopyrimidine glycosylase; N-glycosyl hydrolases.

En las últimas décadas, las estrategias para abordar la problemática de exposición a xenobióticos han cambiado, y actualmente es de gran interés para la comunidad científica, no solo evaluar las fuentes y niveles de exposición ambiental sino también los efectos biológicos tempranos en el material genético. Lo anterior, con el propósito de identificar y alertar sobre los factores de riesgo para el desarrollo de problemas de salud asociados a la exposición ocupacional/ambiental a agentes xenobióticos.

Los pintores de carros son una población que se encuentra expuesta a metales pesados (plomo, cromo, aluminio, entre otros), pigmentos residuales de monómeros de plástico contenidos en las pinturas y a mezclas complejas de solventes orgánicos (hidrocarburos aromáticos y alifáticos, cetonas, alcoholes, ésteres, entre otros) (1-3). El tiner es la mezcla compleja de solventes orgánicos más usada entre los pintores de carros, y según estudios *in vitro*, este compuesto ha mostrado tener efectos genotóxicos en linfocitos humanos (4). Otros estudios realizados a nivel *in vitro* e *in vivo* (5,6) han demostrado que mediante el proceso de biotransformación de los solventes orgánicos se generan especies reactivas de oxígeno (EROs) y radicales libres que afectan significativamente a lípidos, proteínas y al ADN. Estudios de biomonitorio que emplean biomarcadores de efecto temprano como frecuencia de alteraciones cromosómicas (AC), micronúcleos (MN) y daño en el ADN evidenciado por el ensayo cometa, también han mostrado el potencial genotóxico y en consecuencia el riesgo de desarrollar cáncer por la exposición ocupacional crónica a los solventes orgánicos (7-11). Sin embargo, son muy pocas las investigaciones que han caracterizado el tipo de

daño en el ADN (oxidativo o metilante) de células humanas de individuos expuestos a estos compuestos. Cabe destacar que este tipo de identificación permitirá dilucidar el mecanismo de acción de los solventes orgánicos y pinturas sobre el material genético, además de evidenciar en la población objeto de estudio posibles deficiencias en los mecanismos de reparación del ADN, que podrían considerarse como un factor de riesgo para desarrollo de enfermedades asociadas con inestabilidad genética.

El ensayo cometa es una prueba citogenética molecular lo suficientemente sensible para detectar niveles bajos de daño genético (roturas de cadena, sitios lábiles al álcali y sitios de reparación por escisión de bases incompleta) presentes como daño basal en células normales o como el resultado de la exposición a bajas dosis de agentes genotóxicos (12,13). Para incrementar la sensibilidad y especificidad de esta prueba, se han incorporado tratamientos enzimáticos con glicosilasas (enzimas de la reparación del ADN) que convierten las lesiones específicas en roturas de cadena, que incrementan la intensidad de la cola del cometa (indicador de un aumento de daño al ADN) en comparación con los controles no tratados con la(s) enzima(s), permitiendo la estimación de la frecuencia de este tipo de lesión en el ADN. Algunas de las enzimas utilizadas en el ensayo cometa son la formamidopirimidina ADN glicosilasa (Fpg) que remueven bases oxidadas (7,8-dihidro-8-oxo-2'-deoxiguanina (8-oxoGua)) u otros productos formamidopirimidina (4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapydAde) y 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapydGua)); y la 3-metiladenina-ADN glicosilasa II (AlkA), que remueve bases metiladas (3-metiladenina (3-MeAde) y 7-

metilguanina (7-MeGua)), generando sitios apurínicos (AP), que posteriormente son transformados a roturas de cadena cuando el ADN es sometido a pH alcalino durante la electroforesis (14,15). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue estimar el daño oxidativo y metilante en el ADN de linfocitos de pintores de carros expuestos a solventes orgánicos y pinturas, mediante el ensayo cometa de alta eficiencia con la inclusión de las enzimas Fpg y AlkA, respectivamente.

Materiales y métodos

Grupos de estudio

Se realizó un estudio de tipo corte transversal analítico con comparación entre grupos, expuestos y no expuestos. El muestreo aplicado fue no probabilístico (por conveniencia) e incluyó a hombres saludables en un rango de edad entre 18 y 55 años, todos residentes en el departamento del Cauca, Colombia. Se excluyeron del estudio los individuos fumadores, los que manifestaron padecer en el momento de la toma de la muestra infecciones agudas (virales o bacterianas), quienes presentaban antecedentes de cáncer, y los que habían sido sometidos a quimioterapia o algún tipo de radiación con fines terapéuticos o diagnósticos durante los 3 meses previos a la colección de la muestra de sangre. Luego, teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión, se seleccionaron 62 pintores en talleres de latonería y pintura de carros del sector informal, y 62 individuos no expuestos ocupacionalmente a solventes y pinturas. Los individuos del grupo expuesto incluidos en el estudio, laboraban como pintores por un tiempo mayor o igual a 5 años. Los individuos de ambos grupos fueron emparejados por edad (± 2 años) y estrato socioeconómico. El estudio fue evaluado y avalado por los

comités de Ética de la Universidad del Cauca y de la Universidad del Valle, bajo las directrices de la Declaración de Helsinki (16), El Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, “CIOMS”, La Organización Mundial de la Salud, “OMS” (17), y la Resolución 8430 de 1993 de Colombia (18). Todos los participantes del estudio fueron informados sobre los objetivos, metodología y riesgos de la investigación, antes de obtener su consentimiento informado. Asimismo, se les tomó una anamnesis que colectó datos demográficos, antecedentes ocupacionales, estado de salud y estilo de vida.

Muestras de sangre y aislamiento de linfocitos

Las muestras de sangre de la totalidad de participantes del estudio fueron tomadas durante un tiempo de muestreo de 3 meses (junio - agosto), en horas de la mañana (entre 9:00 am y 12:00 m) del tercer día de una semana de actividad laboral. De cada individuo se obtuvieron 5 mL de sangre periférica total, colectada por venopunción en tubos vacutainer con EDTA. Los linfocitos fueron aislados con Ficoll-Histopaque (1077-1 Sigma), y el *pellet* celular fue resuspendido en 1,5 mL de medio RPMI 1640 (R-8758 Sigma).

Controles positivo y negativo

El correcto desarrollo de la metodología del ensayo y la eficiencia de cada corrida electroforética fueron comprobados usando controles internos (positivo y negativo). Para establecer estos controles se realizaron cultivos primarios y tratamiento *in vitro* de linfocitos aislados de sangre periférica de un donador voluntario, saludable, no fumador, de 23 años. Se cultivaron aproximadamente $3,0 \times 10^4$ linfocitos/pozo con medio RPMI 1640 (pH 7,2) suplementado con L-

glutamina, antibiótico, fitohemaglutinina y suero bovino fetal, en microplatos de 96 pozos por 24 h a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, el control interno positivo fueron linfocitos tratados con 40 µM de peróxido de hidrógeno, H₂O₂ (CAS 7722-84-1, Sigma 30% v/v) por 30 min, y con 2,26 mM de etilmetanosulfonato, EMS (CAS 62-50-0, Sigma >99%) por 2 horas a 37°C. Como control negativo se utilizaron linfocitos suspendidos en *buffer* fosfato salino (PBS, P-3813-10 Sigma).

Viabilidad celular

Tanto los linfocitos de las muestras de la población objeto de estudio como de los controles internos (positivo y negativo), fueron contados y analizados para determinar la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión con el colorante vital azul de tripano (T-6146 Sigma) al 0,1% en PBS. Los linfocitos aislados de los individuos objeto de estudio presentaron una viabilidad >96% y, los linfocitos cultivados empleados como controles internos presentaron una viabilidad celular entre 80 y 90% (datos no mostrados).

Ensayo cometa de alta eficiencia y digestión enzimática

El ensayo cometa se basó en el método alcalino estándar usado por Singh *et al.*, (19) con algunas modificaciones para la versión de alta eficiencia (20,21) y la inclusión de enzimas glicosilasas Fpg (Formamidopirimidina ADN glicosilasa, Cat. M0240L, New England Bio-Labs) y AlkA (Alquiladenina ADN glicosilasa Humana Cat. M0313, New England Bio-Labs) (12,14). Las modificaciones aplicadas aquí proponen simplificar el proceso incrementando el número de muestras que se procesan en cada montaje experimental, sin alterar la capacidad de detección del daño en el ADN, existente en cada muestra. Por tal razón, estas modificaciones

fueron validadas (calibración) en el laboratorio de Toxicología genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, antes de aplicarlas para la obtención de resultados experimentales concretos (datos no mostrados).

Para el establecimiento de los microgeles, aproximadamente 10.000 linfocitos por individuo fueron embebidos en 90 μ L agarosa de bajo punto de fusión (A-9414 Sigma) al 0,5%. De esta suspensión celular se tomaron 5 μ L que fueron depositados sobre un Gelbond® Film (Lonza Copenhagen ApS, Denmark, 54727). En cada Gelbond® Film (dimensiones 16 cm x 11 cm) se depositaron muestras duplicadas de individuos expuestos y no expuestos (dos microgeles por individuo), al igual que las muestras de los controles internos positivos y negativo. Para el ensayo con incubación enzimática se prepararon cuatro Gelbond® Film idénticos por montaje experimental, que fueron etiquetados como “daño basal”, “*buffer* de reacción”, “Fpg” y “AlkA” (figura 1).

Luego de la solidificación de los microgeles, los cuatro Gelbond® Film fueron sumergidos en una solución de lisis (cloruro de sodio, NaCl 2,5 M (S-9625 Sigma); ácido etilenediaminotetraacético disódico, Na₂EDTA 100 mM (E-5134 Sigma); Tris 10 mM (T-3253 Sigma); tritón X-100 (K-0320 Sigma) al 1% (v/v); dimetilsulfoxido, DMSO (D-8779 Sigma) al 10% (v/v) y pH 10), y mantenidos en oscuridad durante toda la noche a 4°C.

El Gelbond® Film sin tratamiento enzimático ni incubación fue etiquetado como “daño basal”. Este proporcionó el valor de referencia correspondiente a la totalidad de daños sobre el ADN incluyendo roturas de cadena (RC) simples o dobles, RC originadas por sitios lábiles al álcali o sitios de reparación incompleta, sin hacer

distinción entre ellas. Mientras que los Gelbond® Film etiquetados como “*buffer* de reacción”, “Fpg” y “AlkA” fueron sometidos a incubación y tratamiento enzimático para revelar RC y lesiones específicas en el ADN (8-oxodG, FapydAde, FapydGua, 3-meA y 7-meG).

Antes de la incubación, los tres Gelbond® Films fueron lavados con *buffer* de reacción enzimática (HEPES 70 mM (83264 Sigma), KCl 0,1 M (P9541 Sigma), Na₂EDTA 2 mM (E-5134 Sigma), y SBA 0,26 mg/ml (Fermentas), pH = 7,6. Luego, alícuotas de 50 µL del *buffer* de reacción o de las enzimas glicosilasas Fpg y AlkA a una concentración de 1 µg/mL, fueron goteadas sobre cada uno de los microgeles en los Gelbond® Film según su etiqueta, e incubados durante 30 minutos a 37 °C. Para la desnaturalización y desenrollamiento del ADN, los cuatro Gelbond® Films fueron sumergidos en *buffer* alcalino (NaOH 10 N, S-8045 Sigma; Na₂EDTA 200 Mm, E-5134 Sigma, pH 13,3) por 40 minutos, y luego sometidos a electroforesis por 30 minutos a 28 V y 300 mA (0,9 V/cm). Los microgeles fueron lavados con un *buffer* de neutralización (Tris 0,4 M, T-3253 Sigma, pH 7,5) para retirar la solución alcalina y, posteriormente fueron deshidratados con etanol absoluto frío. Las condiciones de tratamiento enzimático y de electroforesis fueron consideradas óptimas y válidas, sólo si los controles internos positivo y negativo cumplían con los resultados esperados después de la electroforesis (figura 2). Para el registro de cometas, los microgeles fueron coloreados con bromuro de etidio (20 µg/mL, E-7637 Sigma). Se realizó un recuento sistemático aleatorio de 50 nucleoides por cada microgel (100 nucleoides por individuo) a una magnificación de 400x, usando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse

E400). El análisis de las imágenes fue realizado mediante el programa Komet® 6 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, Reino Unido). El daño en el ADN fue determinado para cada individuo objeto de estudio mediante el porcentaje de ADN en la cola, y aquellos nucleoides indicadores de muerte celular (*clouds*) fueron excluidos del registro.

Análisis estadístico de los datos

Para obtener los valores de daño oxidativo o metilante “neto”, se calculó la diferencia entre el valor de porcentaje de ADN en la cola obtenido tras la digestión enzimática (con Fpg o AlkA) y el valor de las RC plus. Este valor RC plus fue determinado mediante la diferencia entre los valores de porcentaje de ADN en cola obtenido luego de la incubación con *buffer* de reacción y porcentaje de ADN en cola obtenido sin incubación enzimática (daño basal). Los datos fueron analizados mediante las pruebas de *Kolmogorov Smirnov* y *Levene*, para determinar normalidad y homogeneidad de varianzas, respectivamente. Las características demográficas fueron analizadas mediante la prueba t-student y Chi-cuadrado (X^2). Para determinar las diferencias entre las categorías de daño en el ADN y los grupos de estudio, se realizaron las pruebas de *Kruskal-Wallis* y *U de Mann Whitney*. La categoría “daño basal” fue considerada como valor de referencia para comparar la frecuencia del “daño oxidativo o metilante neto”. La relación entre el daño en el ADN con la edad (años) y el tiempo de exposición (años en el oficio de pintor) se analizó mediante la prueba de correlación de *Spearman*. Mientras que la relación entre el daño en el ADN y el consumo de alcohol se analizó mediante la prueba *U de Mann Whitney*. El nivel crítico de

rechazo de la hipótesis nula fue considerado a valores de $p \leq 0.05$, y todos los datos fueron procesados y analizados utilizando el software estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences for windows, release 13, SPSS Inc., Chicago, IL).

Resultados

En el cuadro 1 se resumen las principales características demográficas de los grupos de estudio. Los resultados indicaron que ambos grupos de estudio son semejantes en edad promedio (años) y consumo de alcohol, puesto que no se encontraron diferencias significativas ($p = 1,000$) para estas variables entre los grupos. En la anamnesis los pintores manifestaron estar expuestos a una gran variedad de solventes como el tiner, aguarras, varsol, acetonas, gasolina, resinas (epóxido y poliuretano), pinturas a base de solventes, entre otros. También reportaron que poseían una carga laboral muy variable (6 a 12 horas por día), y que el área de trabajo era poco ventilada. Ninguno de los pintores usaba equipo de protección personal (EPP) como guantes de silicona, traje protector y/o gafas para evitar el contacto dérmico con los solventes y pinturas. Solo el 37,1% manifestó el uso de equipo de protección respiratoria (EPR), específicamente máscaras con filtros de carbón activado. No obstante, la mayoría de los pintores reportaron no cambiar los filtros con frecuencia, por lo tanto esta variable no fue tomada en cuenta para la estadística inferencial. Con respecto al consumo de alcohol, el 75,8% de los individuos reportaron una ingesta entre baja a moderada, y se catalogaron como consumidores sociales.

En el cuadro 2 se muestran los valores de la mediana y los rangos intercuartílicos del porcentaje (%) del ADN en cola estimado en linfocitos de individuos de ambos grupos de estudio, para cada una de las categorías de daño en el ADN analizadas. Los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,005$) en los valores de porcentaje de ADN en la cola entre el grupo expuesto y el grupo no expuesto, para las tres categorías de daño evaluadas.

Posteriormente, al comparar dentro de cada grupo de estudio (expuestos y no expuestos) se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre el daño oxidativo “neto” y el “daño basal” (valor de referencia). Por el contrario, no se registraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el daño metilante “neto” y el “daño basal”.

Al realizar el análisis de correlación de *Spearman*, los resultados revelaron que no existía diferencia estadísticamente significativa entre la edad y los valores de “daño basal” ($p = 0,535$, $r = 0,056$) y daño metilante “neto” en el ADN ($p = 0,104$, $r = 0,147$). Mientras que para el daño oxidativo “neto” se observó una asociación estadísticamente significativa con la edad ($p < 0,039$, $r = 0,185$). Con relación al tiempo de exposición (años) a los solventes orgánicos, no se observó una asociación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre esta variable y las tres categorías de daño en el ADN.

Discusión

La exposición ocupacional a solventes orgánicos es un problema de salud pública a nivel mundial (22) y, de acuerdo con el Ministerio de la Protección Social de Colombia, es una problemática de interés nacional (23). En las últimas décadas,

investigaciones científicas evidencian que el 80% de todos los cánceres son causados por la exposición ambiental/ocupacional a agentes químicos, físicos o biológicos (24,25). Según la “*International Agency for Research on Cancer*”, IARC existe suficiente evidencia en humanos de carcinogenicidad por exposición ocupacional en el oficio de pintor (26), y estudios de cohorte evidencian que los pintores presentan un riesgo ocupacional de desarrollar cáncer de páncreas, pulmón y vejiga (27-29).

Con relación a la genotoxicidad atribuida al oficio de pintor de carros, se observó que bajo las condiciones dadas en el presente estudio, la exposición a solventes orgánicos y pinturas induce un incremento significativo ($p = 0,005$) en la frecuencia de RC en el ADN y purinas oxidadas (8-oxodG, FapydAde y FapydGua). Estos resultados permiten suponer que el daño en el ADN es generado durante el metabolismo celular de los solventes orgánicos y por el ingreso de metales pesados (contenidos en las pinturas) al organismo, los cuales incrementan el estrés oxidativo y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y radicales libres en los individuos expuestos. Estos datos soportan la hipótesis de que el estrés oxidativo podría cumplir un papel relevante en los efectos biológicos causados por los solventes orgánicos y que este puede ser la causa principal o secundaria en la etiología de enfermedades como las neurodegenerativas, cáncer, entre otras (28).

Se conoce que el tolueno y el etilbenceno, componentes del tiner, mezcla compleja de solventes más empleada entre los pintores de carros del departamento del Cauca (7), una vez ingresan al organismo tiene una alta afinidad

con el sistema enzimático del metabolismo de xenobióticos y son biotransformados a través de vías metabólicas menores a metilhidroquinona y metilbenzoquinona, y etilhidroquinona y 4-etilcatecol, respectivamente. Estas quinonas durante los procesos de óxido-reducción (redox) generan la sobreproducción de EROs como el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y los radicales hidroxilo ($\bullet OH$) (30-32), los cuales por ser altamente electrofílicos, interactúan con los centros nucleofílicos de las bases nitrogenadas y con los enlaces carbono-hidrógeno de las pentosas e inducen RC en el ADN y sitios AP (33), evidenciadas por el incremento en el porcentaje de ADN en la cola en linfocitos de individuos expuestos.

Por otro lado, lesiones como 8-oxodG, FapydGua y FapydAde al no ser reparadas eficientemente por el mecanismo de reparación por escisión de bases (REB), desestabilizan la conformación electrónica del ADN, alteran las propiedades de apareamiento de las bases nitrogenadas y generan una mayor frecuencia de mutaciones tipo transversión GC→AT, AT→GC (33-35). La frecuencia incrementada de este tipo de mutaciones en los genes que regulan procesos celulares como la replicación del ADN, la progresión del ciclo celular y control de los puntos de chequeo, la segregación de cromosomas, y la reparación del ADN, conlleva a la inestabilidad genómica característica de células tumorales. Por lo tanto, los pintores de carros podrían considerarse una población en mayor riesgo de desarrollar cáncer u otras enfermedades degenerativas, asociadas con altos niveles de estrés oxidativo.

El daño oxidativo en el ADN registrado en el presente estudio, concuerda con el reportado por Martínez-Alfaro *et al.*, quienes mediante la aplicación del ensayo cometa alcalino convencional, empleando la enzima Fpg, detectaron un incremento significativo en el daño en el ADN de linfocitos de ratas expuestas a vapores de tiner, así como un incremento en las concentraciones de malondialdehído (producto de la peroxidación lipídica), y una reducción significativa en la expresión de glutatión (antioxidante no enzimático), biomarcadores ampliamente usados para determinar estrés oxidativo (6).

Con relación al daño metilante y según las condiciones dadas en este estudio, el tratamiento con la enzima AlkA no reveló este tipo de daño en los grupos de estudio. Es bien conocido que la mayoría de los agentes xenobióticos inducen una mayor frecuencia daño oxidativo en el ADN y en menor proporción daño metilante (15,36). Sin embargo, no se puede afirmar de forma concluyente que el material genético no podría sufrir de daño metilante, puesto que los pintores de carros no solo están expuestos a productos aromáticos como el tolueno y el etilbenceno, sino también a productos alifáticos acetilados como el 2,3-dimetilhexano (componente del tiner) que pueden ser transportados durante los procesos metabólicos e intervenidos por la acetil coenzima A, con lo que podrían liberar grupos metilo que se unen covalentemente al ADN.

De hecho un estudio realizado por Hoyos *et al.*, mostró un incremento significativo en los niveles de metilación de regiones promotoras de genes específicos (GSTP1, p16(INK4a) y APC) en células epiteliales de la vejiga de pintores de carros respecto a los individuos no expuestos (37). En este estudio también se

observó que, entre los individuos expuestos, aquellos con mayor tiempo de exposición (años) presentaron un incremento en la frecuencia de metilación. Teniendo en cuenta que son relativamente pocos los estudios que han evaluado los efectos de la exposición a solventes orgánicos y pinturas sobre metilación del ADN, se considera necesario seguir realizando investigaciones que permitan dilucidar los mecanismos de daño sobre el ADN por metilación, en individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas. Debido a que la hipermetilación del ADN pueden tener un papel determinante en la tumorigénesis humana mediante el aumento de la proliferación celular, la acumulación de metabolitos genotóxicos en las células, promoviendo la inestabilidad genómica y por lo tanto el desarrollo de enfermedades como el cáncer.

Por otro lado, en este estudio se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,039$) entre el daño oxidativo “neto” y la edad. Según Moller, el daño en el ADN aumenta a mayor edad, lo que es deducible a partir de la base biológica (a mayor edad menor eficiencia en la reparación del ADN) (38). Un estudio realizado por Mladinic *et al.* en una población saludable no expuesta a agentes químicos, reportó un incremento significativo en el daño en el ADN de linfocitos de individuos ancianos ($69,3 \pm 3,7$ años) con respecto a individuos jóvenes ($38,9 \pm 8,8$ años), lo que evidencia la influencia positiva de la edad en los resultados obtenidos mediante el ensayo cometa (39). Por el contrario, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la edad de los participantes del estudio y el “daño basal, sin enzimas” ($p = 0,535$) y metilante “neto” ($p = 0,104$) en el ADN. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos

en otros estudios, los cuales no evidenciaron una asociación significativa entre la edad y el daño en el ADN inducido por los solventes orgánicos (40-42). Aunque también existen estudios de biomonitorio realizados en poblaciones expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos que indican que el envejecimiento es un factor que influencia la expresión del daño en el ADN estimado mediante el ensayo cometa (2,3). Por lo anterior, la asociación positiva entre la edad y el daño en el ADN cuantificado mediante el ensayo cometa, es controversial y aún está en discusión.

Es importante mencionar que la mayoría de los estudios de biomonitorio genético que emplean el ensayo cometa convencional, no analizan la influencia del factor edad con la expresión del daño en el ADN y solo se limitan a describir esta variable en la información demográfica de la población objeto de estudio (estadística descriptiva). Luego es necesario que en futuros estudios se incluyan grupos numerosos de individuos de todas las edades, para establecer el efecto que tiene la edad sobre la expresión del daño en el ADN cuantificado mediante el ensayo cometa.

Con relación al tiempo de exposición, no se encontró una asociación significativa ($p > 0,05$) entre este factor (determinado en años en el oficio) y los diferentes tipos de daño en el ADN (oxidativo y metilante) de linfocitos de pintores de carros. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en otros estudios (40,43). Por el contrario, otras investigaciones han indicado que a un mayor tiempo de exposición ocupacional a solventes orgánicos y pinturas, mayor es la expresión acumulada del daño en el ADN estimado mediante el ensayo cometa (2,42,44). Luego, los

resultados obtenidos con la variable tiempo de exposición son controversiales y se requiere de un mayor análisis en estudios de biomonitorio genético para ser más concluyentes sobre este tipo de asociación. Otro aspecto importante respecto al análisis de esta variable, es que al tratarse de una población de pintores del sector no formal de la industria, estos no tienen certeza respecto al tiempo que llevaban en el oficio de forma continua. Por lo cual la información colectada no permitió identificar grupos o tiempos de exposición medidos de forma exacta, para establecer relaciones directas con el tiempo de exposición crónica.

Una de las principales razones para el uso del ensayo cometa en este estudio, es la coherencia encontrada entre el incremento en los valores de daño en el ADN, registrados mediante el ensayo cometa, y el incremento en la frecuencia de daños cromosómicos expresados en la célula como MN y AC (biomarcadores validados internacionalmente como predictores de riesgo de cáncer) (45,46), en poblaciones expuestas a solventes orgánicos (42,47-49). Por lo tanto, el ensayo cometa de alta eficiencia puede ser considerado como una herramienta útil para ser incorporada en los programas de vigilancia epidemiológica ocupacional (VEO), y para identificar y reducir los riesgos por la exposición ocupacional a solventes orgánicos y pinturas.

Finalmente, en este estudio se observó una asociación entre la exposición a mezclas complejas de solventes orgánicos y pinturas y el daño oxidativo en el ADN de linfocitos de sangre periférica. Además, el incrementado nivel de daño oxidativo en el grupo expuesto podría sugerir que en estos individuos la respuesta a la reparación del ADN no es tan eficiente respecto a los individuos del grupo no

expuesto, específicamente para el mecanismo REB, que permite reparar lesiones por oxidación de bases como 8-oxodG, FapydGua y FapydAde. Estos resultados alertan sobre el potencial genotóxico de los solventes orgánicos y pinturas y, el probable riesgo laboral en pintores de desarrollar enfermedades crónicas como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Además, de hacer un llamado al diseño de estrategias de VEO que permitan medir y mitigar los efectos adversos de dicha exposición, puesto que la eliminación del riesgo es poco probable teniendo en cuenta su labor y a que pertenecen al sector no formal de la industria. También, se busca motivar hacia el desarrollo de actividades de capacitación para concientizar a los trabajadores sobre los riesgos de la exposición a agentes genotóxicos y sobre la necesidad de cumplir con las mínimas medidas de protección personal en los espacios laborales y de adoptar hábitos saludables (autocuidado).

Aunque nuestro estudio proporciona una evidencia preliminar de la interacción gen-ambiente en la población de pintores de carros. Nuestros resultados deben ser validados en estudios prospectivos que proporcionen resultados más robustos para estas interacciones. También se pueden considerar para futuras investigaciones, aumento en el tamaño de la muestra y realizar un muestreo probabilístico. Sin embargo, no deben ser menospreciados los esfuerzos que busquen aportar información sobre la problemática. Segundo, el empleo de biomarcadores de susceptibilidad individual por ejemplo identificación de polimorfismos para los genes del metabolismo o la reparación del ADN que permitan una mayor comprensión de los mecanismos de daño y la eficiencia de la

reparación del mismo. Del mismo modo, establecer niveles de exposición ambiental podría ser una buena alternativa para determinar el nivel y el tipo de agentes genotóxicos a los que están expuestos los pintores. Sin embargo, muestreos del área de trabajo no siempre resultan representativos de la exposición en esta población, debido a que algunos trabajadores manifiestan intermitencia en el oficio de pintor y en el lugar de trabajo. Por lo que podría ser conveniente realizar análisis de biomarcadores de exposición biológica en sangre u orina, a la par con biomarcadores de efecto.

Agradecimientos

A la población objeto de estudio por su participación voluntaria, a la tecnóloga Luz Melida Lemos Mera por su invaluable colaboración en la toma de muestras de sangre, y a los Biólogos Virginia Mosquera y Jeison Perafán, por su excelente e invaluable contribución durante la ejecución del estudio.

Conflicto de interés

Ninguno.

Financiación

Este estudio fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca (Popayán-Colombia), a través de la VII Convocatoria de Apoyo a Proyectos de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación y Creación Artística.

Referencias

1. **IARC.** Painting, Firefighting, and Shiftwork: Occupational Exposure as a Painter. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. p. 42-394.
2. **Moro AM, Brucker N, Charao M, Bulcao R, Freitas F, Baierle M, et al.** Evaluation of genotoxicity and oxidative damage in painters exposed to low levels of toluene. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2012 Jul;746(1):42-8. English. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.02.007>
3. **Cassini C, Calloni C, Bortolini G, Garcia S, Dornelles M, Henriques J, et al.** Occupational risk assessment of oxidative stress and genotoxicity in workers exposed to paints during a working week. Int J Occup Environ Health. 2011;24(3):308-19. <https://doi.org/10.2478/s13382-011-0030-2>
4. **Londoño-Velasco E, Hidalgo-Cerón V, Escobar-Hoyos LF, Hoyos-Giraldo LS.** Assessment of genomic damage and repair on human lymphocytes by paint thinner in vitro. Toxicol Mech Methods. 2014;24(4):243-9. PubMed PMID: 24236478. <https://doi.org/10.3109/15376516.2013.862893>
5. **Costa C, De Pasquale R, Silvari V, Barbaro M, Catania S.** In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. Toxicol In Vitro. 2006 Apr;20(3):324-31. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.08.007>
6. **Martinez-Alfaro M, Palma-Tirado L, Sandoval-Zapata F, Carabez-Trejo A.** Correlation between formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg)-sensitive sites determined by a comet assay, increased MDA, and decreased glutathione

during long exposure to thinner inhalation. *Toxicol Lett.* 2006 Jun;163(3):198-205.

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.10.021>

7. **Hoyos-Giraldo LS, Carvajal S, Cajas-Salazar N, Ruiz M, Sanchez-Gomez A.** Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes. *Mutat Res.* 2009 Jun;666(1-2):8-15. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.03.003>
8. **Testa A, Festa F, Ranaldi R, Giachelia M, Tirindelli D, De Marco A, et al.** A multi-biomarker analysis of DNA damage in automobile painters. *Environ Mol Mutagen.* 2005;46(3):182-8. <https://doi.org/10.1002/em.20147>
9. **Aksoy H, Yilmaz S, Celik M, Yuzbasioglu D, Unal F.** Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers. *J Appl Toxicol.* 2006 Jan-Feb;26(1):10-5. <https://doi.org/10.1002/jat.1098>
10. **Villalba-Campos M, Ramírez-Clavijo SR, Sánchez-Corredor MC, Rondón-Lagos M, Ibáñez-Pinilla M, Palma RM, et al.** Quantification of cell-free DNA for evaluating genotoxic damage from occupational exposure to car paints. *J Occup Med Toxicol.* 2016;11(1):33. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12995-016-0123-8>
11. **Londono-Velasco E, Martinez-Perafan F, Carvajal-Varona S, Garcia-Vallejo F, Hoyos-Giraldo LS.** Assessment of DNA damage in car spray painters exposed to organic solvents by the high-throughput comet assay. *Toxicol Mech Methods.* 2016;26(4):238-42. <https://doi.org/10.3109/15376516.2016.1158892>

12. **Collins A, Duthie S, Dobson V.** Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. Carcinogenesis. 1993;14(9):1733.
13. **Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al.** Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen. 2000;35(3):206-21.
14. **Collins AR, Dusinska M, Horska A.** Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. Acta Biochim Pol. 2001;48(3):611-4.
15. **Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Rykala J, Kolacinska A, et al.** Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. Mutat Res. 2004;554(1–2):139-48.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.04.001>
16. **World Medical Association.** World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects: World Medical Association; 2008.
17. **OWH.** Standards and Operational Guidance for Ethics Review of Health-Related Research with Human Participants. World Health Organization; 2011. p. 55.
18. **Ministerio de Salud.** Resolución Numero 8430 de 1993 (Octubre 4). Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Santafé de Bogotá: Ministerio de Salud. Dirección de Desarrollo Científico y Tecnológico; 1993. p. 19.

19. **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):184-91.
20. **Azqueta A, Gutzkow KB, Priestley CC, Meier S, Walker JS, Brunborg G, et al.** A comparative performance test of standard, medium- and high-throughput comet assays. *Toxicol In Vitro.* 2013 Mar;27(2):768-73.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.006>
21. **Gutzkow KB, Langleite TM, Meier S, Graupner A, Collins AR, Brunborg G.** High-throughput comet assay using 96 minigels. *Mutagenesis.* 2013 May;28(3):333-40. <https://doi.org/10.1093/mutage/get012>
22. **Lynge E, Anttila A, Hemminki K.** Organic solvents and cancer. *Cancer Causes Control.* 1997;8(3):406-19.
23. **Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Cancerología.** Plan Nacional para el control del Cáncer en Colombia, 2012.
[Fecha de consulta: septiembre 14 del 2018]. Disponible en:
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INCA/plan-nacional-control-cancer.pdf>
24. **Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA,** editors. *Environmental and chemical carcinogenesis*, 2004: Elsevier: 473-486
25. **Clapp RW, Howe GK, Jacobs MM.** Environmental and occupational causes of cancer: a call to act on what we know. *Biomed Pharmacother.* 2007;61(10):631-9. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.08.001>

26. **IARC.** Chemical Agents and Related Occupations: Occupational exposure as a painter. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans; 2012. p. 509 - 39.
27. **Brown LM, Moradi T, Gridley G, Plato N, Dosemeci M, Fraumeni JF.** Exposures in the painting trades and paint manufacturing industry and risk of cancer among men and women in Sweden. J Occup Environ Med. 2002 Mar;44(3):258-64.
28. **Ramanakumar AV, Parent ME, Richardson L, Siemiatycki J.** Exposures in painting-related occupations and risk of lung cancer among men: results from two case-control studies in Montreal. Occup Environ Med. 2011 Jan;68(1):44-51. <https://doi.org/10.1136/oem.2009.049957>
29. **Alguacil J, Porta M, Malats N, Kauppinen T, Kogevinas M, Benavides FG, et al.** Occupational exposure to organic solvents and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. Carcinogenesis. 2002;23(1):101-6. PubMed PMID: 1214.
30. **Murata M, Tsujikawa M, Kawanishi S.** Oxidative DNA damage by minor metabolites of toluene may lead to carcinogenesis and reproductive dysfunction. Biochem Biophys Res Commun. 1999;261(2):478-83. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1041>
31. **Midorikawa K, Uchida T, Okamoto Y, Toda C, Sakai Y, Ueda K, et al.** Metabolic activation of carcinogenic ethylbenzene leads to oxidative DNA

damage. Chem Biol Interact. 2004 Dec;150(3):271-81.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.09.020>

32. **Gaikwad NW, Bodell WJ.** Formation of DNA adducts in HL-60 cells treated with the toluene metabolite p-cresol: a potential biomarker for toluene exposure. Chem-Biol Interact. 2003;145(2):149-58.

33. **Dizdaroglu M.** Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. Cancer Lett. 2012 Dec;327(1-2):26-47.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.016>

34. **Bruner SD, Norman D, Verdine GL.** Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. Nature, . 2000;403(6772):859. <https://doi.org/10.1038/35002510>

35. **Kino K, Sugiyama H.** Possible cause of G --> C transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone. Chem Biol. 2001;8(4):369-78.

36. **Arabski M, Klupinska G, Chojnacki J, Kazmierczak P, Wisniewska-Jarosinska M, Drzewoski J, et al.** DNA damage and repair in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa cells. Mutat Res. 2005 Feb;570(1):129-35.

<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.10.006>

37. **Hoyos-Giraldo LS, Escobar-Hoyos LF, Saavedra-Trujillo D, Reyes-Carvajal I, Munoz A, Londono-Velasco E, et al.** Gene-specific promoter methylation is associated with micronuclei frequency in urothelial cells from individuals exposed to organic solvents and paints. J Expo Sci Environ Epidemiol. 2016;26(3):257-62. <https://doi.org/10.1038/jes.2015.28>

38. **Moller P.** Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res.* 2006 Mar;612(2):84-104.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.10.001>
39. **Mladinic M, Kopjar N, Milic M, Dasovic AB, Huzak M, Zeljezic D.** Genomic instability in a healthy elderly population: a pilot study of possible cytogenetic markers related to ageing. *Mutagenesis.* 2010 Sep;25(5):455-62.
<https://doi.org/10.1093/mutage/geq027>
40. **Fracasso ME, Doria D, Carrieri M, Bartolucci GB, Quintavalle S, De Rosa E.** DNA single- and double-strand breaks by alkaline- and immuno-comet assay in lymphocytes of workers exposed to styrene. *Toxicol Lett.* 2009 Feb;185(1):9-15. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.11.010>
41. **Sul D, Lee D, Im H, Oh E, Kim J, Lee E.** Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene. *Toxicol Lett.* 2002;134(1-3):87-95.
42. **Roma-Torres J, Teixeira JP, Silva S, Laffon B, Cunha LM, Méndez J, et al.** Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutat Res.* 2006;604(1–2):19-27.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.12.005>
43. **Sardas S, Omurtag GZ, Tozan A, Gul H, Beyoglu D.** Evaluation of DNA damage in construction-site workers occupationally exposed to welding fumes and solvent-based paints in Turkey. *Toxicol Ind Health.* 2010 Oct;26(9):601-8.
<https://doi.org/10.1177/0748233710374463>

44. **Zhu CQ, Lam TH, Jiang CQ.** Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2001 Apr;491(1-2):173-81.
45. **Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al.** An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2006;.28(3):625. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl177>
46. **Bonassi S, Hagmar L, Stromberg U, Montagud AH, Tinnerberg H, Forni A, et al.** Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res.* 2000;60(6):1619-25.
47. **Heuser VD, Erdtmann B, Kvitko K, Rohr P, da Silva J.** Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology.* 2007 Apr;232(3):235-47.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.01.011>
48. **Martino-Roth M, Viegas J, Roth D.** Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genet Mol Res.* 2003;2(4):410-7.
49. **Pereira da Silva VH, Gomes de Moura CF, Spadari-Bratfisch RC, Ribeiro DA.** Cytogenetic biomonitoring of peripheral blood and oral mucosa cells from car painters. *Toxicol Mech Methods.* 2012 Sep;22(7):497-501.
<https://doi.org/10.3109/15376516.2012.680621>

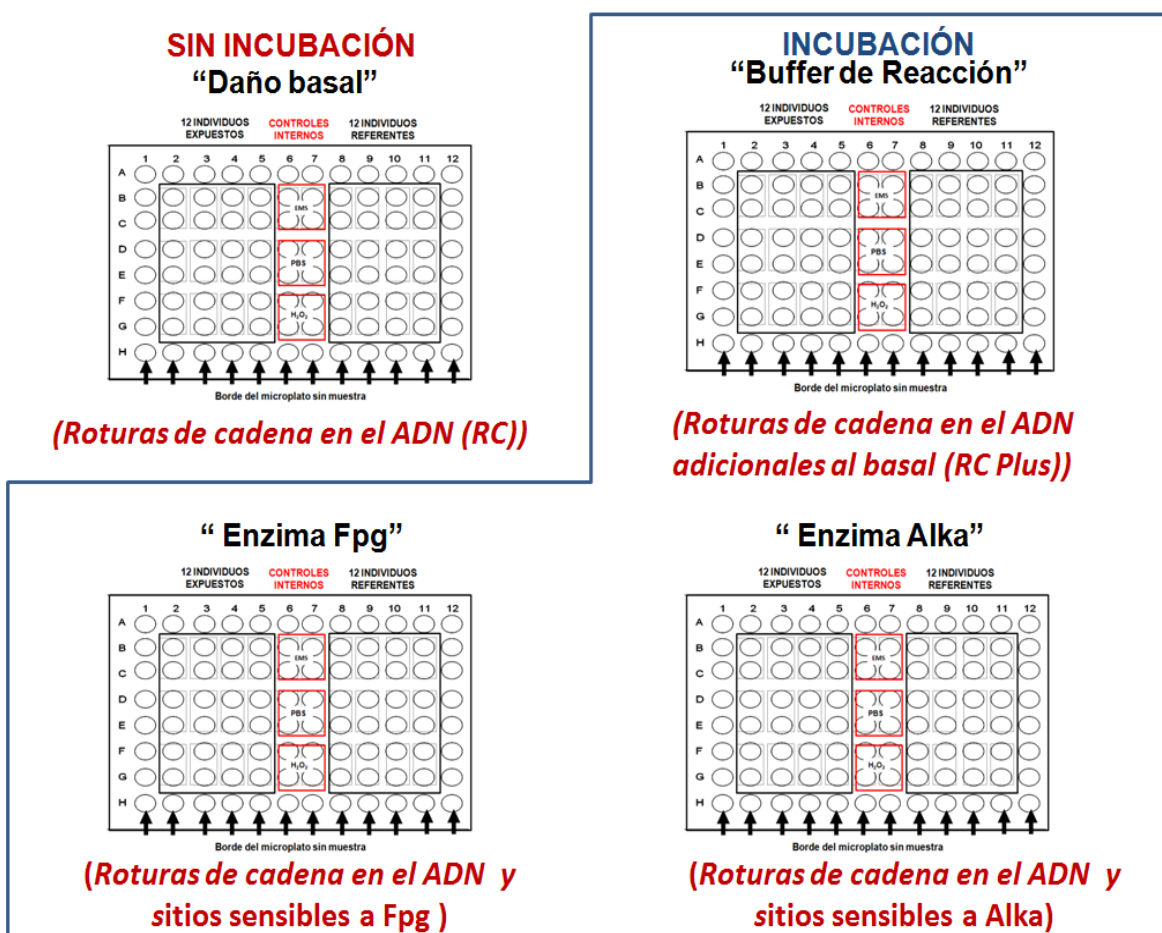


Figura 1. Distribución de los microgeles sobre el Gelbond® Film. Se establecieron sobre el Gelbond® Film 2 microgeles por cada individuo de estudio y, 4 microgeles por cada control interno, para un total de 60 microgeles. H₂O₂ Peroxido de hidrogeno, EMS: etilmetanosulfonato, PBS: *buffer* fosfato salino.

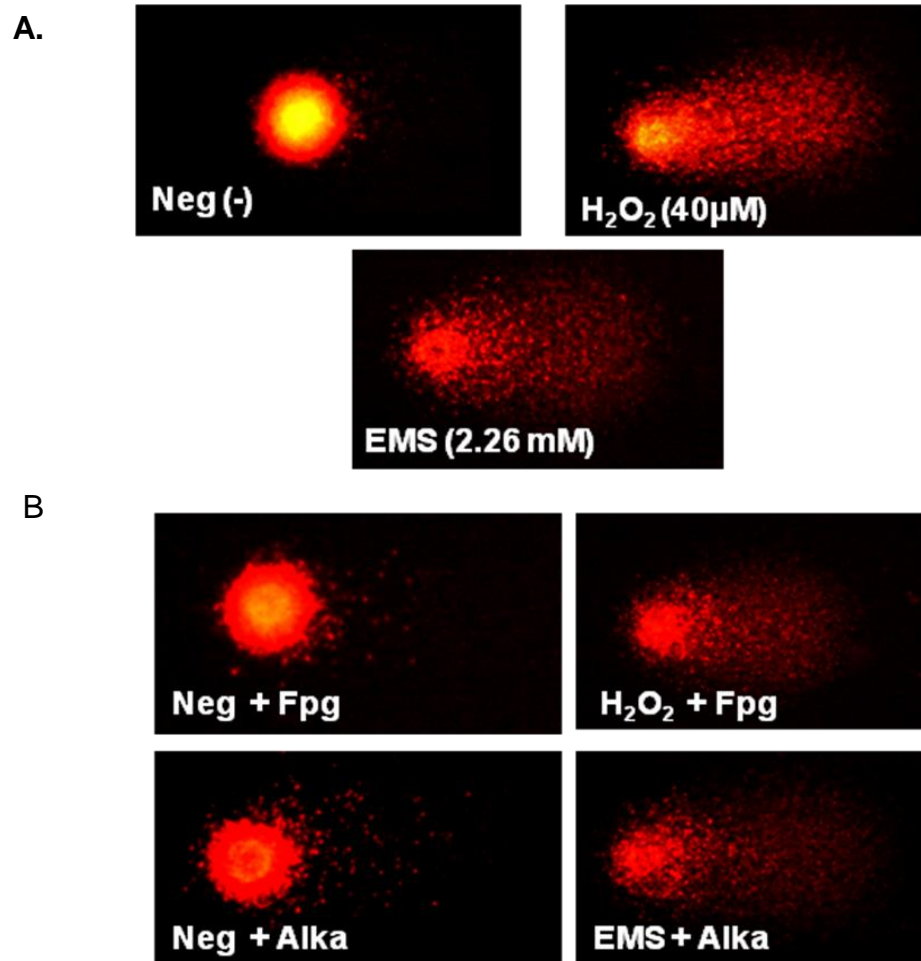


Figura 2. Imágenes de nucleoides de los linfocitos humanos empleados como controles negativo (suspendidos en PBS) y positivos (con 40 μM H_2O_2 y 2.26mM EMS) en cada una de las condiciones de tratamiento enzimático. **A.** Nucleoides sin incubación enzimática. **B.** Nucleoides con incubación enzimática: Fpg y Alka. Magnificación de 400X en microscopio de fluorescencia y coloración con bromuro de etidio.

Cuadro 1. Características demográficas de los grupos de estudio

Características	No expuestos	Expuestos	<i>p</i>
	<i>n</i> = 62	<i>n</i> = 62	
Edad (años)			
Media ± EE	40,35 ± 1,15	39,87 ± 1,11	0,76 ^a
Rango (mínimo - máximo)	18-55	19 - 54	
Tiempo de exposición (años)			
Media ± EE	NA	19,10 ± 1,054	NA
Rango (mínimo- máximo)	NA	5 – 38	NA
Uso de equipo de protección personal (EPP) de las vías respiratorias n (%)			
No usa	NA	39 (62,9)	NA
Usa	NA	23 (37,1)	NA
Consumo de alcohol n (%)			
No consumo	15 (24.2)	15 (24.2)	1,000 ^b
Consumo (entre bajo a moderado)	47 (75.8)	47 (75.8)	

EE: error estándar. NA: no aplica

^a Prueba *t* de *student*.

^b Prueba Chi cuadrado (X^2).

Cuadro 2. Porcentaje de ADN en la cola estimado para linfocitos de individuos de los grupos de estudio, entre las categorías de daño en el ADN.

Categorías de daño en el ADN	Porcentaje de ADN en la cola (%)		
	Mediana; RIC		
	No expuestos (n = 62)	Expuestos (n = 62)	<i>p</i>
“Daño basal”	7,81; 12,92	12,53; 20,89	<0,001 ^b
Daño oxidativo “neto”	12,87; 53,83 ^c	16,50; 46,49 ^c	0,005 ^b
Daño metilante “neto”	7,73; 45,01	14,00; 37,77	<0,001 ^b
<i>P</i>	<0,001 ^a	<0,001 ^a	

RIC: Rango intercuartílico

^a Significancia estadística entre las categorías de daño en el ADN (Daño basal, Daño oxidativo “neto” y Daño metilante “neto”) mediante la prueba de *Kruskal-Wallis*.

^b Significancia estadística entre los grupos de estudio (no expuesto y expuesto) para cada categoría de daño mediante la prueba *U de Mann-Whitney*

^c Diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las categorías de daño oxidativo “neto” en el ADN con respecto al “daño basal, sin enzimas” para cada grupo de estudio, mediante la prueba *U de Mann-Whitney*.

